PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/4344				
C12Q 1/68	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. November 1997 (20.11.97)				
(21) Internationales Aktenzeichen: (22) Internationales Anmeldedatum: (23) Prioritätsdaten: (196 19 362.1 14. Mai 1996 (14.05.96) (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ETIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludi (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIFFERT, [DE/DE]; Schönleinstrasse 49, D-45147 Essen (D. (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLED-67056 Ludwigshafen (DE).	I BASF Al wigshaf Winfri E).	IL, JP, KR, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.				

INVERÅNDERUNG IM GEN FÜR DIE HUMANE G-PROTEIN \$3-UNTEREINHETT ZUR DIAGNOSTIK VON ERKRANKUNGEN

(57) Abstract

The present invention relates to the use of a mutation in the gene for human G-protein β 3 sub-unit for diagnosing illnesses.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein β 3-Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

			Danielan.	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL	Albanien	ES	Spanien Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AM	Armenien	FI	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	LU	Luxenburg	SN	Senegal
AT	Osterreich	FR	Frankreich	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑU	Australien	GA	Gabun	MC	Monaco	TD	Tschad
AZ	Aserbaidechen	GB	Vereinigtes Königreich		Republik Moldau	TG	Togo
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgica	MD		T)	Tadachikistan
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TM	Turkmenistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TR	Turkei
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TT	Trinidad und Tobago
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali		-
BL	Benin	IE	Irland	MN	Mongolci	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	rr	Italien	MX	Mexiko		Amerika
Gr	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
cc	Kongo	KK	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM			Korta	PL	Polen		
	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ.	Tachechische Republik	u	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dinemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Batland	LK	Process				
ŀ							

WO 97/43442 PCT/EP97/02250

VERWENDUNG EINER GENVERÄNDERUNG IM GEN FÜR DIE HUMANE G-PROTEIN β 3-UNTEREINHEIT ZUR DIAGNOSTIK VON ERKRANKUNGEN

5 Beschreibung

35 9:1059-1066, 1995).

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostik von Erkrankungen mittels Genanalyse, insbesondere der Analyse von Genen für Untereinheiten der humanen Guaninnukleotid-bindenden 10 Proteine (G-Proteine).

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) haben eine herausragende Bedeutung bei der intrazellulären Signaltransduktion. Sie vermitteln die Weiterleitung extrazellulärer 15 Signale nach Stimulation von Hormonrezeptoren und anderen Rezeptoren, welche nach Rezeptoraktivierung eine Konformationsänderung durchmachen. Dies führt zur Aktivierung von G-Proteinen, welche nachfolgend intrazelluläre Effektoren (z.B. Ionenkanäle, Enzyme) aktivieren oder hemmen können. Heterotrimere G-Proteine sind aus 20 drei Untereinheiten, den α -, β - und γ -Untereinheiten zusammengesetzt. Bislang wurden mehrere unterschiedliche α-Untereinheiten, 5 β-Untereinheiten und ca. 12 y-Untereinheiten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden nachgewiesen (Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M. Signal transduction by G proteins: 25 1994 edition. J. Recept. Res. 15:213-252, 1995; Offermanns, S. and Schultz, G. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 350:329-338, 1994; Nürnberg, B., Gudermann, T., and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of 30 transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. J.Mol.Med. 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of Transmembrane Signals. Cell

Die rezeptorvermittelte Aktivierung bestimmter -Untereinheiten kann durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin (PTX) gehemmt werden. Dazu gehören insbesondere die α-Isoformen αil, αi2 und αi3, sowie 40 unterschiedliche o -Untereinheiten. Solche G-Proteine werden auch als "PTX-sensitive G-Proteine" bezeichnet.

80:249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. FASEB J.

Es wurde gefunden, daß sich eine Genveränderung im Gen für humanes G-Protein $\beta3$ -Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen eignet. Diese Genveränderung eignet sich insbesondere zur Ermitt-

lung des Risikos , an einer Krankheit, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Er- 5 mittlung eines relativen Erkrankungsrisikos an mit G-Protein- Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten für einen Probanden, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gensequenz für humanes G-Protein β 3-Untereinheit des Probanden mit der Gensequenz SEQ ID NO:1 vergleicht und für den Fall, daß an Position 825 ein Thymin (T) vorliegt, dem Probanden ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.

Die gefundene Genveränderung befindet sich im Gen für humanes GProtein ß3-Untereinheit. Dieses Gen ist von Levine et al. (Proc.
Natl. Acad. Sci USA, Vol 87, Seite 2329-2333, (1990) beschrieben

15 worden. Der codierende Bereich hat an Position 275 ein Ser-Codon
(TCC), während Probanden mit erhöhtem Risiko für eine Erkrankung,
die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, an dieser Position
das ebenfalls für Ser codierende Codon TCT besitzen. Die Genveränderung ist eine Basensubstitution an Position 825, bei der ein

20 Cytosin (C) durch Thymin (T) ersetzt ist. Auf Aminosäureebene ist
dieser Basenaustausch jedoch "stumm", d.h. er führt nicht zum
Einbau einer anderen Aminosäure an dieser Position. Die bei Probanden mit erhöhtem Erkrankungsrisiko gefundene Sequenz ist in
SEQ ID NO:1 im Sequenzprotokoll dargestellt.

Die gefundene Genveränderung tritt in der Regel in heterozygoter Form auf.

Unter Krankheiten, die mit einer G-Protein Fehlsteuerung asso-30 ziiert sind, sind solche Erkrankungen zu verstehen, bei denen das G-Protein in der Signaltransduktion involviert ist und seine Funktion nicht in physiologischer Weise erfüllt.

Die Fehlsteuerung kann eine Reihe von Ursachen haben, beispiels-35 weise eine Veränderung im Strukturgen oder eine veränderte Genexpression.

Bei den Erkrankungen handelt es sich u.a. um Herz-Kreislauf Erkrankungen, Stoffwechselstörungen und Immunerkrankungen.

Als Herz-Kreislauf Erkrankungen sind zu nennen:

40

Hypertonie, Schwangerschaftshypertonie (Gestose, "hypertension in pregnancy"), koronare Herzkrankheit, lokalisierte und/oder gene-45 ralisierte Atherosklerose, Stenosen der Blutgefäße, Restenose nach revaskularisierenden Gefäßeingriffen (z.B. PTCA mit und ohne Stentimplantation), Apoplexneigung. Thromboseneigung und gesteigerte Thrombozytenaggregation.

Als Stoffwechselstörungen sind zu nennen:

5

Metabolisches Syndrom, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, Typ II-Diabetes mellitus, diabetische Komplikationen (z.B. Nephropathie, Neuropathie, Retinopathie, etc.) Fettstoffwechselstörungen, gestörte zentrale Chemorezeption (CO2-Toleranz, Azidosetoleranz, plötzlicher Kindstod (SIDS)).

Als Immunerkrankungen sind zu nennen:

Gestörte Stärke der körpereigenen Immunantwort (Bildung von Immunglobulinen, Aggressivität von T-Zellen und NK-Zellen), gestörte generelle Proliferationsneigung inkl. Wundheilungsvermögen, Neigung zur Tumorentstehung und Proliferation inkl. Metastasierungspotential maligne transformierter Zellen, Dauer der Latenzzeit nach HIV-Infektion bis zum klinischen Ausbruch der Erkrankung, Kaposi-Sarkom, Neigung zu Leberzhirrose, Transplantatoleranz und Transplantatabstoßung.

Die erfindungsgemäße Verwendung der Genmutation eignet sich besonders zur Ermittlung des Erkrankungsrisikos an Hypertonie.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung von transgenen Tieren, die die oben beschriebene Genmutation tragen. Solche transgenen Tiere sind vor allem als Tiermodelle für die Untersuchung und Therapie der oben beschriebenen Krankheiten von 30 großer Bedeutung. Die Verfahren zur Erzeugung transgener Tiere sind dem Fachmann allgemein bekannt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Ermittlung des relativen Erkrankungsrisikos wird einem Probanden Körpermaterial entnommen, 35 das die genetische Information des Probanden enthält. Dies wird in der Regel durch Blutentnahme und Isolierung der Nukleinsäure hieraus erreicht.

Aus der isolierten Nukleinsäure des Probanden wird die Genstruk- 40 tur für das G-Protein $\beta 3$ -Untereinheit ermittelt und mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenz verglichen.

Die Ermittlung der Genstruktur kann durch Sequenzierung der Nukleinsäure erfolgen. Dies kann entweder direkt aus der 45 genomischen DNA oder nach Amplifizierung der Nukleinsäure beispielsweise mittels PCR-Technik erfolgen. Die Genstruktur kann auf genomischer Ebene oder auch auf mRNA oder cDNA Ebene erfolgen.

Bevorzugt ist die Ermittlung durch Sequenzierung nach PCR-Ampli-5 fikation der cDNA. Die für die PCR-Reaktion geeigneten Primer lassen sich für den Fachmann leich aus den in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenzen ableiten. Man verfährt dabei vorteilhafterweise so, daß jeweils ein Strang und Gegenstrang bindender Primer vor und nach der relevanten Basenposition 825 gewählt wird.

10

Der Genvergleich kann jedoch auch mit anderen Methoden, beispielsweise durch selektive Hybridisierung oder durch entsprechende Kartierung mit Restriktionsenzymen durchgeführt werden. Der Basenaustausch C→T an der oben beschriebenen Position 15 825 führt zum Verlust einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Dsa I, was ebenfalls dem Nachweis dieses genetischen Polymorphismus dient.

Wenn der Proband an der Position 825 ein Thymin (T) trägt, ist 20 ihm ein höheres Erkrankungsrisiko zuzuordnen als einem Pobanden mit einem Cytosin (C) an dieser Position.

Die Erfindung ist in den folgenden Beispielen weiter veranschaulicht.

25

Beispiel 1

Nachweis der Genveränderung bei Hypertonikern durch Sequenzierung

- 30 In Voruntersuchungen konnte eine gesteigerte Aktivierbarkeit PTXsensitiver G-Proteine bei Patienten mit essentieller Hypertonie
 nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelang in immortalisierten
 Zellen solcher Patienten, die als phänotypischen Marker eine gesteigerte Aktivität des Na/H- Austauschers aufweisen. Die gestei-
- 35 gerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine hat wichtige Konsequenzen für die Zellfunktion. Dazu gehören eine gesteigerte Bildung intrazellulärer "second messenger" Moleküle (z.B. Inositol-1,4,5-trisphosphat), eine gesteigerte Freisetzung intrazellulärer Ca²⁺-Ionen, eine vermehrte Bildung von Immunglobulinen
- 40 und ein beschleunigtes Zellwachstum. Da diese Veränderungen in immortalisierten Zellen und nach langer Zellkulturdauer nachzuweisen sind, kann man davon ausgehen, daß diese Veränderung genetisch fixiert ist (Rosskopf, D., Frömter, E., and Siffert, W. Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immorta-
- 45 lized lymphoblasts from essential hypertensive patients-a cell culture model for human hypertension. *J.Clin.Invest.* 92:2553-2559, 1993; Rosskopf, D., Hartung, K., Hense, J., and

10 tial hypertension. J.Clin.Invest. 96:759-766, 1995).

Siffert, W. Enhanced immunoglobulin formation of immortalized B cells from hypertensive patients. Hypertension 26:432-435, 1995; Rosskopf, D., Schröder, K.-J., and Siffert, W. Role of sodium-hydrogen exchange in the proliferation of immortalised lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects. Cardiovasc.Res. 29:254-259, 1995; Siffert, W., Rosskopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Beckmann, S., and Jakobs, K.H. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essen-

Aus immortalisierten Zellinien von Hypertonikern wurde nach Standardverfahren RNS präpariert und mittels der reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Mittels Polymerase-Kettenreaktion 15 (PCR) wurde die für die G-Proteinuntereinheit G3 kodierende cDNS amplifiziert und sequenziert. Für die PCR-Reaktion wurden die folgenden Oligonukleotid-Primer eingesetzt:

5'-TGG GGG AGA TGG AGC AAC TG und 20 5'-CTG CTG AGT GTG TTC ACT GCC.

Im Vergleich zu der von Levine et al. publizierten Sequenz (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T., Jr., Helman, L.J., and Ahn, T.G. Molecular cloning of β3 subunit, a third form of the G protein β-subunit polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2329-2333, 1990) wurde in der cDNS aus Hypertonikerzellen die folgende Abweichung gefunden: Nukleotid 825 Cytosin (C) im Bereich der kodierenden Sequenz wird durch ein Thymin (T) ersetzt (Nukleotid 1 entspricht der Base A des Startcodons ATG).
30 Dieser Basenaustausch führt zu einem stummen Polymorphismus, d.h. die durch das entsprechende Basentriplett kodierte Aminosäure (Serin) wird gegenüber der Originalsequenz nicht verändert. Die gefundene DNA-Sequenz ist in SEQ ID NO:1 beschrieben.

35 Beispiel 2

Nachweis der Genveränderung bei Hypertonikern durch Restriktionsenzym-Analyse

40 In der Abbildung ist ein Genvergleich von Normotonikern und Hypertonikern durch Restriktionsenzymanalyse dargestellt. Hier wurde die mittels PCR amplifizierte, für G3 kodierende cDNS aus Zellen von Normotonikern (NT) und Hypertonikern (HT) einer Restriktionsenzymanalyse mit dem Enzym Dsa I unterzogen. Die Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, was in der Abbildung dargestellt ist.

WO 97/43442 PCT/EP97/02250

Man erkennt in der Abbildung deutlich die vollständige Restriktion der G3 cDNS aus Normotonikerzellen nach Verdau mit Dsa I. Die cDNS aus Hypertonikerzellen wird nur teilweise durch Dsa I geschnitten. Neben den zu erwartenden Schnittprodukten ergibt sich zudem ungeschnittenes PCR-Produkt. Links und rechts sind Referenzfragmente (Marker) zum Größenvergleich aufgetragen. Vier von fünf der hier dargestellten DNA-Sequenzen von Hypertonikern zeigen den oben beschriebenen Basenaustausch und sind für diese Veränderung heterozygot.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
 - (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
 - (C) ORT: Ludwigshafen
 - (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
 - (F) POSTLEITZAHL: D-67056
 - (G) TELEPHON: 0621/6048526
 - (H) TELEFAX: 0621/6043123
 - (I) TELEX: 1762175170
- (ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Diagnostik von Krankheiten

mittels Genanalyse

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2
 - (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:
 - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)
- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:
 - (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÂNGE: 1517 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Doppel
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iii) ANTISENSE: NEIN
 - (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 - (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 1..1024
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG GGG GAG ATG GAG CAA CTG CGT CAG GAA GCG GAG CAG CTC AAG AAG

Met Gly Glu Met Glu Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Lys

1 5 10 15

CAG ATT GCA GAT GCC AGG AAA GCC TGT GCT GAC GTT ACT CTG GCA GAG
Gln Ile Ala Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Val Thr Leu Ala Glu

20 25 3

CTG GTG TCT GGC CTA GAG GTG GTG GGA CGA GTC CAG ATG CGG ACG CGG 144

Leu Val Ser Gly Leu Glu Val Val Gly Arg Val Gln Met Arg Thr Arg
35 40 45

CGG ACG TTA AGG GGA CAC CTG GCC AAG ATT TAC GCC ATG CAC TGG GCC 192

Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Ala
50 60

ACT GAT TCT AAG CTG CTG GTA AGT GCC TCG CAA GAT GGG AAG CTG ATC 240

Thr Asp Ser Lys Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile
65 70 75 80

GTG TGG GAC AGC TAC ACC ACC AAC AAG GTG CAC GCC ATC CCA CTG CGC 288

Val Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg 85 90 95

TCC TCC TGG GTC ATG ACC TGT GCC TAT GCC CCA TCA GGG AAC TTT GTG

Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Phe Val

W	0 97/4	3442					_								,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	•
							8									
			100					105					110		mcc.	384
GCA	TGT	GGG	GGG	CTG	GAC	AAC	ATG	TGT	TCC	ATC	TAC	AAC	CIC	AAA	Cor	204
Ala	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Met	Cys	Ser	11e	ıyr	125	ren	nys	SET	
		115					120		~~ ~	o mm	mcm		CNC	AC A	CCT	432
CGT	GAG	GGC	AAT	GTC	AAG	GTC	AGC	CGG	GAG	CTT	TCT	772	Uic	Whr	Glv	132
Arg	Glu	Gly	Asn	Val	ГЛЗ	Val	Ser	Arg	GIU	Leu	Ser	Ara	пів	1111	GLY	
	130					135					140	2 000	C/D/C	NCC.	እሮሮ	480
TAT	CTC	TCC	TGC	TGC	CGC	TTC	CTG	GAT	GAC	AAC	AAT	ALL	Val	Thr	Ser	
Tyr	Leu	Ser	Cys	Суѕ	Arg	Pne	ren	Asp	АБР	155	POII	110	***		160	
145					150	000	mmc	mcc	CAC		GAG	ልሮጥ	GGG	CAG		528
TCG	GGG	GAC	ACC	ACG	TGT	GCC	116	TGG	Agn	TIA	Glu	Thr	Glv	Gln	Gln	
Ser	Gly	Asp	Thr		Сув	ATA	ьеи	TID	170	116	014		423	175		
			TTT	165	003	CAC	200	cem	CAC	ሞርር	ልጥ ር	AGC	CTG		GTG	576
AAG	ACT	GTA	. TTT	GTG	GGA	UAC	Mh~	Cly	yen	Cvs	Met	Ser	Leu	Ala	Val	
Lys	Thr	Val			GTĀ	птэ	TILL	185	nop	CJD			190			
			180 TTC		CTC	mmc	עוייט ע	TO2	GGG	GCC	TGT	GAT	-		GCC	624
TCI	CCT	GAC	Phe	AAT	LIC	Dho	Tla	Ser	Glv	Ala	Cvs	Ast	Ala	Ser	Ala	
Ser	Pro			ASII	neu	FIIC	200	Der	013		-,-	205	,			
		195	GAT	CTC	CCA	GAG	GGG	ACC	TGC	CGT	CAG	ACT	TTC	ACT	GGC	672
AAG	CIU	. 1G() ASI	. Val	Arn	Glu	Glv	Thr	Cvs	Arg	Gln	Thi	Phe	Thr	Gly	
	216	١				215					244	,				
73 /	210	' mc	2 GA(ነ ልጥር	: AAC	: GCC	: ATC	: TGI	TTC	TTC	ccc	: AA	GG?	GAG	GCC	720
CAC	Cl	, Co.	r Agt	. Tle	Asr	Ala	Ile	Cys	Phe	Phe	Pro	Ası	ı Gly	g Glu	Ala	
	-				23(1				235	•				240	
3.00		~ AC	G GG(TC	GAT	r GAC	GC?	r TCC	TGC	CGC	TTC	IT	r gac	CTC	CGG	768
TI	e Cv	s Th	r Gl	y Sei	Ası	Ası	Ala	a Ser	Cys	arç	, Le	ı Ph	e Ası	י שע י	r wra	
				241	5				251	,				43.	,	216
GC.	A GA	C CA	G GA	G CT	G AT	C TG	C TT	CTC	CA(C GA	G AG	CAT	CAT	C TG	C GGC	816
Al	a As	p G1	n Gl	u Le	ı Il	e Cy	s Pho	e Se	r Hi	s Gli	ı Se:	r Il	6 TT	e Cy:	g Gly	
			26	Λ				26:	5				21	U		864
ΑT	C AC	G TC	T GT	G GC	C TT	C TC	C CT	C AG	T GG	C CG	C CT	A CT	A TT		r GGC	904
11	e Th	r Se	r Va	1 A1	a Ph	e Se	r Le	u Se	r Gl	y Ar	g Le	л те	u Pn	e Al	a Gly	
		27	E				28	0				⊿ 0	၁			912
TA	C GA	C GP	C TI	CAA	C TG	CAA	T GT	C TG	G GA	C TC	C AT	G AA	.G 10	r Gl	G CGT	722
Ту	r As	p As	p Ph	e As	n Cy	s As	n Va	1 Tr	p as	p se	1 me	ע הא	2 26	I GI	u Arg	
	29	0				29	5		a 20	C CT	טנ סגיטי	יט בר חדם	יר כיו	יה פה	A GTC	960
G	'G GG	C A	rc Ci	C TC	T GG	C CA	C GA	T. AA	L AG	a Na	1 90	r Cs	rs Le	u Gl	A GTC y Val	
		y I	le re	eu Se	T G1	.у н. ^	S AS	פא עו	il br	31	5	,			320	
30)5				31	.ט יותי ריח	ייר פר	יר אר	יא פני	ጥ ጥር	.C TO	G G	AC AC	C TI	C CTC	1008
A(CA GO	CT G	AC GC	AL MA		o Va	1 21	a Th	or GI	v Se	er Tr	TO A	sp Se	er Ph	e Leu	
				21) E				333	10				23		
_		nc m	CC N	እር ጥ(יט עני כי	GAGG	CTG	GAG A	AAAG(GAA	T G	GAAG	GCAG'	r GA	CACACTC	1064
			rp A		k	0										
	_		2	4 10												
	CCXC	רררר	o mo	cccc	ACCC	CAT	CTCA	TTC 2	AGGT	GTTC'	TC T	TCTA	TATT	C CG	GTGCCAT	1124
				mmom		ጥር እ	CCCC	አርጥ (CCCC	AGCA'	IG G	GACI	いょしし	C II	TOGGEOG	, 1104
_				2020	CCCC	AAA	CDDC	ጥርር	CCCA	TCTC	CT C	CCAT	ひいしし	TIC	CCICCCC	T 75.33
_				CCMC	መሮሮሮ	V chab.	ልማሚል	CCA	AGGA	CAAC	CT G	ccc	TUCU	C AG		, 2002
					A CITIC	ጥርን	CCCC	የተ ር አ	CCCC	CTAG	GA T	TUCI		C MG	いらっていててい	1 1301
					COMO	CODA	ጥአርር	מרכ	Chindral	CCCC	.1G 1	CACI	AIGG	\sim 10	100000	7 250.0
(TAGG	GTC	CT GO	CCCI	CTTC	TTA	TTCA	TGC	TalalC	TCCT	TT I	TCT	CCTI	T TT	TTCTCTC	1517
•	raag <i>i</i>	CAC	CT GO	:AAT	AAGT	GT?	AGCAC	CCT	GGT							121/
,	(2)	INFO	RMAT	ON 2	U SE	Q II	NO:	2:								

PCT/EP97/02250

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 341 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Glu Met Glu Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Lys 10 5

Gln Ile Ala Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Val Thr Leu Ala Glu 25 20

Leu Val Ser Gly Leu Glu Val Val Gly Arg Val Gln Met Arg Thr Arg 40

Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Ala 55

Thr Asp Ser Lys Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile 75 70

Val Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg 90 85

Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Phe Val 105 100

Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Met Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Ser 125 120

Arg Glu Gly Asn Val Lys Val Ser Arg Glu Leu Ser Ala His Thr Gly 135

Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Asn Asn Ile Val Thr Ser 155 150

Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln 170 165

Lys Thr Val Phe Val Gly His Thr Gly Asp Cys Met Ser Leu Ala Val 185

Ser Pro Asp Phe Asn Leu Phe Ile Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ala 205 200

Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Thr Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly 220 215

His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Pro Asn Gly Glu Ala 235 230

Ile Cys Thr Gly Ser Asp Asp Ala Ser Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg 250 245

Ala Asp Gln Glu Leu Ile Cys Phe Ser His Glu Ser Ile Ile Cys Gly 265

Ile Thr Ser Val Ala Phe Ser Leu Ser Gly Arg Leu Leu Phe Ala Gly 280

Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ser Met Lys Ser Glu Arg 300 295

Val Gly Ile Leu Ser Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val 315 310

Thr Ala Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu 335 330 325

Lys Ile Trp Asn * 340

10

Patentansprüche

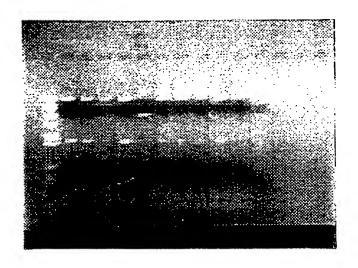
- 1. Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein β 3-Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen.
 - 2. Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein β 3-Untereinheit zur Ermittlung des Risikos , an einer Krankheit, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.
 - Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Genveränderung im Codon für die Aminosäure 275 in SEQ ID NO:1 liegt.
- Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß an Position 825 in SEQ ID NO:1 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt.
- 20 5. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Krankheit eine Herz-Kreislauf-Erkrankung, eine Stoffwechselstörung oder eine Immunerkrankung ist.
- Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die
 Krankheit Hypertonie ist.
 - 7. Verfahren zur Ermittlung eines relativen Erkrankungsrisikos an mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten für einen Probanden, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gensequenz für humanes G-Protein β3-Untereinheit des Probanden mit der Gensequenz SEQ ID NO:1 vergleicht und für den Fall, daß
- quenz für humanes G-Protein p3-Untereinneit des Probanden mi der Gensequenz SEQ ID NO:1 vergleicht und für den Fall, daß an Position 825 ein Thymin (T) vorliegt, dem Probanden ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.
- 35 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Genvergleich durch Sequenzierung vorgenommen wird.
- Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Sequenzierung ein Genabschnitt, der Position 825 beinhaltet, amplifiziert wird.
 - Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß daß der Genvergleich durch Hybridisierung durchgeführt wird.

WO 97/43442 PCT/EP97/02250

 Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Genvergleich durch Spaltung mittels Restriktionsenzymen durchgeführt wird.

5 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Restriktionsenzym Dsa I verwendet wird.

AT HT HT HT HT HT HT HT



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No PCT/EP 97/02250

A CLASSIF	C12Q1/68		
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classification	tion and IPC	
B FIFLDS	SEARCHED		
Minimum do IPC 6	cumentation searched (classification system followed by classification ${\tt C12Q}$	symbols)	
Documentation	on searched other than minimum documentation to the extent that suc	h documents are included in the fields se	urched
	ata base consulted during the international search (name of data base a	and, where practical, search terms used)	
Electronic da	EER CESTS CONTRACTED GENERAL SECTION OF THE SECTION		
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	vant passages	REPUBLIC CLARIT NO.
A	COTTON R G H: "CURRENT METHODS OF MUTATION DETECTION" MUTATION RESEARCH, vol. 285, 1 January 1993, pages 125-144, XP000443992 see the whole document	:	1-12
A	LEVINE ET AL.: "MOLECULAR CLONING BETA3 SUBUNIT, A THIRD FORM OF THE PROTEIN BETA-SUBUNIT POLYPEPTIDE" PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 87, 1990, pages 2329-2333, XP002041163 cited in the application see the whole document	G OF E G	1-12
		/	
X Fu	rther documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	in annex.
"A" document consists "E" earlier filing "L" document which citatis "O" document consists "P" document consists	ment defining the general state of the art which is not idered to be of particular relevance or document but published on or after the international g date ment which may throw doubts on priority claim(s) or h is cited to establish the publication date of another ion or other special reason (as specified) ment referring to an oral disclosure, use, exhibition or r means	To later document published after the interpretation or priority date and not in conflict we cited to understand the principle or invention "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot be inventive step when the different of particular relevance; the cannot be considered to involve an indocument is combined with one or ments, such combined with one or in the art. "A." document member of the same pater	the department of the chained invention of the considered to counter is taken alone a claimed invention invention invention invention invention and the chained invention of the counter of the chained invention of the counter of the chained invention of the chained invent
	ne actual completion of the international search 19 September 1997	Date of mailing of the international of 1, 10, 97	search report
Name and	d mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5212 Patentiaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hagenmaier, S	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No PCT/EP 97/02250

alegory '	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant	to claim No.
1	SIFFERT ET AL.: "ENHANCED G PROTEIN ACTIVATION IN IMMORTALIZED LYMPHOBLASTS FROM PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION" J. CLIN. INVEST., vol. 96, 1995, pages 759-766, XP802041164 see the whole document	1	12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati es Aktenzeichen
PCT/EP 97/02250

A. KLASSIF IPK 6	IZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C12Q1/68		
Nach der Inte	rnationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassi	ifikation und der IPK	
B. RECHER	CHIERTE GEBIETE		
Recherchierte IPK 6	r Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole C12Q		
Recherchierte	aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sowe	it diese unter die recherchierten Gebiete	fallen
Während der	internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Nam	ne der Datenbank und evil. verwendete	Suchbegnife)
CALSWE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	COTTON R G H: "CURRENT METHODS OF MUTATION DETECTION" MUTATION RESEARCH, Bd. 285, 1.Januar 1993, Seiten 125-144, XP000443992 siehe das ganze Dokument		1-12
A	LEVINE ET AL.: "MOLECULAR CLONING BETA3 SUBUNIT, A THIRD FORM OF THE PROTEIN BETA-SUBUNIT POLYPEPTIDE" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 87, 1990, Seiten 2329-2333, XP002041163 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	6 OF E G	1-12
∏ We	itere Veröffenslichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	Siehe Anhang Patentfamilie	
* Besonder *A Veröf *A Veröf *E ältere *Anm *L' Veröf schei ande sott eausy *O' Verö eine *P' Veröf dem Datum de	re Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : ffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist 2 Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedatum veröffentlicht worden ist fentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsampruch zweifelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie eführt) ffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Bernstzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht ffentlichung, die vor dem internationalen Ammeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	1' Spätere Veröffentlichung, die nach de oder dem Prioritätedatum veröffentlichung zugrundeliegenden Prinzir Theorie angegeben ist X' Veröffentlichung von besondere Beckann allein aufgrund dieser Veröffentlichung von besonderer Beckann nicht als auf erfinderischer Tängkeit beruhend bet veröffentlichung in Veröffentlichung in Veröffentlichung in Veröffentlichung für einen Fachmar Achtendedatum des internationalen in 10, 10, 97	one worden ist und interested on mar zum Verständnis des der pe oder der ihr zugrundeliegende leutung; die beanspruchte Erfin- nichtet werden leutung; die beanspruchte Erfin- igkeit beruhend betrachtet mit einer oder mehreren anderer in Verbindung gebracht wird un naheliegend ist liben Patentfamilie ist
1	19. September 1997 d Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswik Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hagenmaier, S	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati ::: Aktenzeichen PCT/EP 97/02250

		PCT/EP 97/0	2230
	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	anden Tale Be	ir. Anspruch Nr.
Kategorie*	Bezeichnung der Veroffentnenung, sowen erforterund ausst Angele		
A	SIFFERT ET AL.: "ENHANCED G PROTEIN ACTIVATION IN IMMORTALIZED LYMPHOBLASTS FROM PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION" J. CLIN. INVEST., Bd. 96, 1995, Seiten 759-766, XP002041164 siehe das ganze Dokument		1-12



(11) Veröffentlichungsnummer:

(11) Publication number:

EP 1 112 362 A0

(11) Numéro de publication:

Internationale Anmeldung veröffentlicht durch die Weltorganisation für geistiges Eigentum unter der Nummer:

WO 00/15785 (art. 158 des EPÜ).

International application published by the World Intellectual Property Organisation under number:

WO 00/15785 (art. 158 of the EPC).

Demande internationale publiée par l'Organisation Mondiale de la Propriété sous le numéro:

WO 00/15785 (art. 158 de la CBE).



- (11) Veröffentlichungsnummer:
- (11) Publication number:

EP 1 112 362 A0

(11) Numéro de publication:

Internationale Anmeldung veröffentlicht durch die Weltorganisation für geistiges Eigentum unter der Nummer:

WO 00/15785 (art. 158 des EPÜ).

International application published by the World Intellectual Property Organisation under number:

WO 00/15785 (art. 158 of the EPC).

Demande internationale publiée par l'Organisation Mondiale de la Propriété sous le numéro:

WO 00/15785 (art. 158 de la CBE).